

**PENGKLONAN DAN PENGEKSPRESAN GEN 24.1 kDa YANG SPESIFIK
DAN ANTIGENIK BAGI *Campylobacter jejuni***

oleh

AZNI AMIR MUSA

**Tesis yang diserahkan untuk memenuhi keperluan bagi
Ijazah Sarjana Sains**

APRIL 2008

PENGHARGAAN

Alhamdulillah, setelah sekian lama, tesis ini berjaya juga disiapkan.

Kepada penyelia saya, Prof. Asma Ismail, jutaan terima kasih diucapkan kerana sudi menerima saya sebagai seorang pelajar dan di atas segala tunjuk ajar, bantuan serta nasihat yang diberikan sehingga selesainya penyelidikan dan tesis ini.

Kepada penyelia bersama, Prof. Mohd Zaki Salleh, terima kasih tidak terhingga di atas kepercayaan, ilmu, idea dan pertolongan yang dicurahkan.

Kepada Dr. Shaharum, Kak Shikin dan Cik Din, terima kasih di atas segala idea dan nasihat yang dikongsi secara langsung ataupun tidak langsung. Kepada Kak Noor dan En. Nasir, terima kasih kerana sudi memberi sokongan teknikal dan membantu sehingga siapnya tesis ini. Tidak dilupakan juga kepada En. Wan Azman yang tidak putus-putus 'melayan' masalah pendaftaran pengajian saya. Tidak dilupakan En. Ridhwan yang sudi berkongsi pengalaman dan ilmu di dalam dunia '*Campy*'.

Kepada rakan-rakan yang bersama-sama bertungkus lumus menjalankan SDS-PAGE; Thiru, Zura, Wee Leng serta Syafiq, terima kasih kerana sudi menjadi peneman sehingga larut malam untuk menyiapkan kerja-kerja makmal. Seterusnya terima kasih kepada semua kakitangan INFORMM dan rakan-rakan yang turut bersama-sama memberikan bantuan sehingga siapnya tesis ini.

Penghargaan yang tidak terhingga juga diucapkan kepada kakitangan Jabatan Mikrobiologi dan Parasitologi Perubatan, Pusat Pengajian Sains Perubatan yang tidak jemu-jemu membantu memberikan sesuatu yang tidak bernilai bagi orang lain tetapi amat bernilai untuk menyiapkan thesis ini.

Akhir sekali, kepada abah dan mak, terima kasih terhadap segala dorongan dan sokongan yang tidak berbelah bagi.

SUSUNAN KANDUNGAN

| | Muka surat |
|--|------------|
| PENGHARGAAN | ii |
| JADUAL KANDUNGAN | iv |
| SENARAI JADUAL | x |
| SENARAI RAJAH | xi |
| SENARAI LAMPIRAN | xii |
| SENARAI PENERBITAN DAN SEMINAR | xiii |
| ABSTRAK | xv |
| ABSTRACT | xvii |
| BAB SATU : PENGENALAN AM | |
| 1.0 Latar belakang <i>Campylobacter jejuni</i> | 1 |
| 1.1 Kepentingan <i>Campylobacter</i> | 2 |
| 1.2 Transmisi dan pencegahan <i>C. jejuni</i> kepada manusia | 4 |
| 1.2.1 Transmisi <i>C. jejuni</i> | 4 |
| 1.2.2 Pencegahan | 6 |
| 1.3 Aspek klinikal jangkitan <i>C. jejuni</i> | 8 |
| 1.3.1 Gejala klinikal | 8 |
| 1.3.2 Komplikasi jangkitan | 9 |
| 1.4 Rawatan | 10 |
| 1.5 Kaedah diagnosis jangkitan <i>C. jejuni</i> | 11 |
| 1.5.1 Mikroskopi | 11 |
| 1.5.2 Pengkulturan | 11 |
| 1.5.3 Ujian untuk pengenalpastian genus dan spesis | 13 |
| 1.5.4 Kaedah serologi | 14 |
| 1.5.5 Kaedah selain pengkulturan dan serologi | 17 |
| 1.6 Tujuan dan rasional penyelidikan | 18 |
| 1.6.1 Masalah pengdiagnosan jangkitan <i>C. jejuni</i> | 18 |
| 1.6.2 Protein permukaan yang spesifik bagi <i>C. jejuni</i> | 19 |
| 1.6.3 Penentuan dan pencirian gen yang mengkodkan protein khusus | 21 |

| | | |
|-------|-----------------|----|
| 1.6.4 | Objektif kajian | 21 |
|-------|-----------------|----|

BAB DUA : BAHAN DAN KAEDAH PENYELIDIKAN AM

| | | |
|---------|--|----|
| 2.1 | Organisma dan sampel kajian | 24 |
| 2.1.1 | Strain bakteria <i>C. jejuni</i> | 24 |
| 2.1.2 | Strain <i>E. coli</i> | 24 |
| 2.1.3 | Penyediaan kultur stok bakteria | 24 |
| 2.1.4 | Serum ujian | 25 |
| 2.2 | Media pertumbuhan | 25 |
| 2.2.1 | Agar Mueller-Hinton | 26 |
| 2.2.2 | Kaldu Luria-Bertani (LB) | 26 |
| 2.2.3 | Agar Luria-Bertani (LB) | 26 |
| 2.2.4 | Agar Luria-Bertani dengan ampisilin | 27 |
| 2.2.5 | Kaldu tripton soya dengan 15% gliserol | 27 |
| 2.3 | Penyediaan penampan dan larutan am | 28 |
| 2.3.1 | Larutan stok antibiotik ampisilin (100 mg/ml) | 28 |
| 2.3.2 | Larutan penampan fosfat 1X (PBS), (pH 7.4) | 28 |
| 2.3.3 | PBS 1X + 5% Tween 20 (PBS T-20) | 28 |
| 2.3.4 | Larutan 10 mM Tris, (pH 8) | 29 |
| 2.3.5 | Larutan 10 mM Tris HCl, (pH 7.4) | 29 |
| 2.3.6 | Larutan 3 M HCl | 29 |
| 2.3.7 | Larutan 3 M NaOH | 30 |
| 2.3.8 | Larutan stok perencat protease | 30 |
| 2.3.9 | Larutan 0.5 M EDTA (pH 8) | 30 |
| 2.4 | Penyediaan bahan untuk pengklonan | 31 |
| 2.4.1 | Larutan 100 mM MgCl ₂ (200 ml) | 31 |
| 2.4.2 | Larutan 100 mM CaCl ₂ | 31 |
| 2.4.3 | Larutan X-gal | 31 |
| 2.4.4 | Penyediaan bahan untuk elektroforesis gel agarosa | 32 |
| 2.4.4.1 | Penyediaan larutan etidium bromida (10 mg/ml) | 32 |
| 2.4.4.2 | Larutan penampan Tris–asetat-EDTA (TAE) 50X | 32 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.4.4.3 | Larutan penampan Tris–asetat-EDTA (TAE) yang diubahsuai | 32 |
| 2.4.4.4 | Penanda DNA 1 kb dan 100 bp. | 33 |
| 2.5 | Penyediaan bahan untuk pengekstrakan protein permukaan <i>C. jejuni</i> | 33 |
| 2.5.1 | Larutan glisina berasid 0.2 M (pH 2.2) | 33 |
| 2.6 | Penyediaan bahan untuk penghasilan dan penulenan protein rekombinan | 34 |
| 2.6.1 | Larutan stok 1 M IPTG | 34 |
| 2.6.2 | Larutan lisozim (10 mg/ml) | 34 |
| 2.6.3 | Penampan lisis | 34 |
| 2.6.4 | Penampan basuhan untuk penulenan protein (8 M urea) | 35 |
| 2.6.5 | Penampan elusi (8 M urea pH 4.5) | 36 |
| 2.7 | Penyediaan larutan penampan untuk elektroforesis gel natrium dodesil sulfat-poliakrilamida (SDS-PAGE), blot Western dan ujian titik EIA | 36 |
| 2.7.1 | Larutan penampan elektroforesis | 36 |
| 2.7.2 | Larutan penampan sampel | 37 |
| 2.7.3 | Larutan penampan pemisah | 37 |
| 2.7.4 | Larutan penampan penyusun | 38 |
| 2.7.5 | Larutan penampan pemindah Towbin | 38 |
| 2.7.6 | Larutan ammonium persulfat (20%) | 39 |
| 2.7.7 | Larutan bis-akrilamida | 39 |
| 2.7.8 | Penanda berat protein (molekul rendah) | 39 |
| 2.7.9 | Pewarna “Coomassie” | 40 |
| 2.7.10 | Pewarna “Amido black” | 40 |
| 2.7.11 | Pewarna “Ponceou S” | 40 |
| 2.7.12 | Larutan akues penyahwarna | 41 |
| 2.7.13 | Substrat A | 41 |
| 2.7.14 | Substrat B | 41 |
| 2.7.15 | Larutan 3% susu tanpa lemak | 42 |
| 2.7.16 | Penyediaan antibodi primer dan sekunder | 42 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 2.8 | Kaedah – kaedah am | 42 |
| 2.8.1 | Kaedah am untuk pengklonan | 42 |
| 2.8.1.1 | Kaedah ekstraksi DNA daripada kultur tulen <i>C. jejuni</i> untuk pengklonan | 42 |
| 2.8.1.2 | Penyediaan sel kompeten | 44 |
| 2.8.1.3 | Transformasi | 45 |
| 2.8.1.4 | PCR dan pengklonan | 46 |
| 2.8.1.4.1 | Penyediaan larutan stok primer | 46 |
| 2.8.1.4.2 | Penyediaan “master mix” tindak balas PCR | 46 |
| 2.8.1.4.3 | Penyediaan lisis bakteria untuk penentuan klon positif | 47 |
| 2.8.1.4.4 | Ekstraksi plasmid rekombinan | 47 |
| 2.8.1.4.5 | Penulenan gen daripada gel agarosa | 48 |
| 2.8.1.4.6 | Penulenan DNA | 49 |
| 2.8.1.4.7 | Penyediaan gel agarosa dan elektroforesis | 49 |
| 2.8.2 | Penghasilan dan penulenan protein natif dan protein rekombinan | 50 |
| 2.8.2.1 | Penghasilan dan penulenan protein natif | 50 |
| 2.8.2.1.1 | Pengekstrakan protein permukaan <i>C. jejuni</i> | 50 |
| 2.8.2.1.2 | Kaedah penulenan protein natif 24.1 kDa daripada protein permukaan | 51 |
| 2.8.2.2 | Kaedah am penghasilan dan penulenan protein rekombinan | 52 |
| 2.8.2.2.1 | Penghasilan protein skala besar untuk tujuan penulenan | 52 |
| 2.8.2.2.2 | Penyediaan kolum untuk penulenan protein | 53 |
| 2.8.2.2.3 | Penyediaan resin untuk penulenan protein. | 54 |
| 2.8.2.2.4 | Penulenan protein | 54 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.8.3 | Kaedah am elektroforesis gel natrium dodesil sulfat-poliakrilamida (SDS-PAGE), blot Western dan ujian titik EIA | 55 |
| 2.8.3.1 | Penyediaan gel SDS-PAGE dan kaedah elektroforesis | 55 |
| 2.8.3.2 | Blot Western | 59 |
| 2.8.3.3 | Ujian titik EIA | 60 |

BAB TIGA : PENGKLONAN DAN PENULENAN PROTEIN

| | | |
|---------|--|----|
| 3.0 | Pengenalan | 61 |
| 3.1 | Kaedah penyelidikan dan keputusan | 63 |
| 3.1.1 | Pengklonan | 63 |
| 3.1.1.1 | Primer | 63 |
| 3.1.1.2 | Amplifikasi PCR untuk pengklonan | 66 |
| 3.1.1.3 | Pengklonan produk PCR ke dalam vektor pCR [®] 2.1-TOPO [®] | 68 |
| 3.1.1.4 | Penyaringan klon positif | 68 |
| 3.1.1.5 | Pengekspresan protein di dalam sistem <i>E. coli</i> . | 72 |
| 3.1.1.6 | Rawatan enzim pembatas | 72 |
| 3.1.1.7 | Ligasi gen ke dalam vektor pengekspresan | 75 |
| 3.1.2 | Pengekspresan dan penulenan protein | 77 |
| 3.1.2.1 | Pengekspresan protein skala kecil | 77 |
| 3.1.2.2 | Penentuan tag histidin | 80 |
| 3.1.2.3 | Penghasilan protein skala besar (1 liter) | 83 |
| 3.1.2.4 | Penentuan keterlarutan protein | 83 |
| 3.1.2.5 | Penyediaan protein untuk penulenan | 84 |
| 3.1.2.6 | Penulenan protein dengan kolum | 86 |
| 3.2 | Perbincangan | 88 |

SENARAI JADUAL

| | | Muka surat |
|------------|--|------------|
| Jadual 1.1 | Antara ciri fenotip spesis <i>Campylobacter</i> yang sering menjangkiti manusia dan perbezaannya dengan <i>C. jejuni</i> | 15 |
| Jadual 2.1 | Penyediaan larutan gel pemisah untuk dua gel mini Protean II | 56 |
| Jadual 2.2 | Penyediaan larutan gel pemisah untuk gel Protean II | 57 |
| Jadual 2.3 | Penyediaan larutan gel penyusun | 57 |
| Jadual 4.1 | Bacaan keputusan pencairan serum berdasarkan Rajah 4.3 | 100 |
| Jadual 4.2 | Bacaan keputusan ujian kepekatan protein RPCj24 | 102 |
| Jadual 4.3 | Bacaan keputusan ujian kepekatan protein natif 24.1 kDa | 103 |
| Jadual 4.4 | Jadual kedudukan keputusan ujian | 107 |
| Jadual 4.5 | Keputusan saringan awal ujian titik EIA | 107 |

SENARAI RAJAH

| | | Muka surat |
|------------|--|------------|
| Rajah 1.1 | Profil SDS-PAGE menunjukkan protein spesifik untuk <i>C. jejuni</i> | 20 |
| Rajah 1.2 | Ringkasan aliran kerja penyelidikan | 23 |
| Rajah 3.1 | Jujukan DNA dan perterjemahan asid amino protein 24.1 kDa | 65 |
| Rajah 3.2 | Produk PCR untuk pengklonan | 67 |
| Rajah 3.3 | Saringan PCR dengan menggunakan primer M13 terbalikan dan primer Cj24R (primer terbalikan) | 70 |
| Rajah 3.4 | Rawatan dengan enzim <i>ECOR1</i> untuk penyaringan klon | 71 |
| Rajah 3.5 | Jujukan DNA | 73 |
| Rajah 3.6 | Kedudukan gen selitan di dalam vektor pengklonan | 74 |
| Rajah 3.7 | Rawatan enzim untuk proses ligasi | 76 |
| Rajah 3.8 | Penyaringan PCR untuk memilih subklon yang positif | 78 |
| Rajah 3.9 | Kedudukan gen selitan di dalam vektor pengekspresan | 79 |
| Rajah 3.10 | Profil SDS-PAGE protein rekombinan | 81 |
| Rajah 3.11 | Penentuan tag histidin | 82 |
| Rajah 3.12 | Profil SDS-PAGE protein sebelum penulenan | 85 |
| Rajah 3.13 | Profil SDS-PAGE protein selepas penulenan | 87 |
| Rajah 4.1 | Blot Western menggunakan protein yang belum ditulenkan | 96 |
| Rajah 4.2 | Blot Western menggunakan protein yang telah ditulenkan | 98 |
| Rajah 4.3 | Penentuan pencairan serum <i>C. jejuni</i> untuk ujian saringan titik EIA | 100 |
| Rajah 4.4 | Ujian kepekatan protein RPCj24 | 102 |
| Rajah 4.5 | Ujian kepekatan protein natif 24.1 kDa | 103 |
| Rajah 4.6 | Bacaan keputusan dot EIA | 105 |

SENARAI LAMPIRAN

| | Muka surat |
|---|------------|
| 1.1 Senarai bahan kimia dan reagen yang digunakan | 121 |
| 1.2 Penentuan ketulenan kultur <i>C. jejuni</i> | 122 |
| 1.3 Abstrak pembentangan kertas kerja | 125 |

SENARAI PENERBITAN DAN SEMINAR

| | Muka surat |
|--|------------|
| <p>1. Pembentangan poster 1 Cloning and Expression of Specific Protein for <i>Campylobacter jejuni</i>. <u>Azni Amir Musa</u>, Noor A'shikin Azahari, Mohd Zaki Salleh, Ridhwan Abdul Wahab, P. Lalitha, Asma Ismail (2003). Poster presented at the 8th National Conference on Medical Sciences "Medicine in Genomic Era", 8-9 May 2003. Health Campus, Universiti Sains Malaysia, Kelantan</p> | 125 |
| <p>2. Pembentangan poster 2 Expression of Specific Protein for <i>Campylobacter jejuni</i>. <u>Azni Amir Musa</u>, Noor A'shikin Azahari, Ridhwan Abdul Wahab, Haslizai Hassan, P. Lalitha, Asma Ismail, Mohd Zaki Salleh (2003). Poster presented at the 2nd International Conference on Bioinformatics 2003, 8-10 September 2003, Pulau Pinang</p> | 126 |
| <p>3. Pembentangan poster 3 Development of protein based rapid diagnostic test for <i>Campylobacter jejuni</i>, 16-20th December (2003). Institute of Graduate Studies, Universiti Sains Malaysia, Pulau Pinang. (Paper selected for best research project competition in RIT month)</p> | 127 |
| <p>4. Pembentangan poster 4 Cloning and expression of specific protein of <i>Campylobacter jejuni</i> in <i>Escherichia coli</i>. <u>Azni Amir Musa</u>, Noor A'shikin Azahari, Ridhwan Abdul Wahab, Haslizai Hassan, P. Lalitha, Asma Ismail, Mohd Zaki Salleh (2003). Poster presented at the 1st National Colloquium and Workshop in Pharmacogenetics, 1-4th April 2004. Health Campus, Universiti Sains Malaysia, Kelantan</p> | 128 |
| <p>5. Pembentangan oral 1 Development of DOT-EIA test using recombinant protein specific for <i>Campylobacter jejuni</i>. <u>Azni A.M</u>, Noor A'shikin A, Ridhwan A.W, Haslizai H, Lalitha P, Asma I, Mohd Zaki S (2004). Oral presentation at the 1st National Diagnostic Conference and Workshop, 4-5 October 2004, Universiti Sains Malaysia, Kelantan</p> | 130 |

6. **Pembentangan oral 2**

131

Cloning and expression of a specific surface- associated protein for *Campylobacter jejuni*. Azni Amir Musa¹, Noor A'shikin Azahari², Ridhwan Abdul Wahab³, Haslizai Hassan¹, Lalitha P³, Asma Ismail¹, Mohd Zaki Salleh⁴. Oral presentation at the 2nd Research Colloquium, Universiti Sains Malaysia, Kelantan

PENGKLONAN DAN PENGEKSPRESAN GEN 24.1 kDa YANG SPESIFIK DAN ANTIGENIK BAGI *Campylobacter jejuni*

ABSTRAK

Campylobacter jejuni adalah spesis enteropatogen yang paling utama di dalam keluarga *Campylobacter* dan merupakan salah satu agen penting yang menyebabkan cirit birit pada manusia di seluruh dunia. Walaupun jangkitan bakteria ini boleh dipulihkan tanpa rawatan, ia sering kali dikaitkan dengan komplikasi yang lebih rumit seperti sindrom Guillain-Barre. Akibat daripada masalah teknikal yang wujud bagi kaedah konvensional yang sedia ada termasuk kekurangan sensitiviti, mahal, melibatkan proses kerja yang cerewet, memakan masa yang panjang dan jumlah pemencilan yang amat rendah; satu ujian yang pantas, spesifik dan mudah amat diperlukan.

Di dalam kajian yang terdahulu, satu protein natif yang spesifik terhadap *C. jejuni* yang beratnya 24.1 kDa, telah dikenalpasti dan merupakan calon yang sesuai untuk membangunkan ujian pantas berasaskan protein. Untuk menggunakan protein ini bagi pembangunan ujian pantas berasaskan protein, ia perlu ditulenkan dalam kuantiti yang banyak. Oleh kerana penghasilan protein natif adalah rumit, mahal dan mengambil masa yang lama, ia perlu dihasilkan secara rekombinan. Melalui kaedah ini, proses penghasilan dan penulenan protein sasaran menjadi lebih mudah dan ekonomik.

Di dalam kajian ini, gen yang mengkodkan protein ini telah diklonkan dan diekspresikan di dalam sistem *E. coli* dan penulenan dilakukan dengan menggunakan

sistem "Ni-NTA affinity chromatography". Ketulenan, antigenisiti dan spesifisiti protein rekombinan yang telah dihasilkan ini ditentukan melalui kaedah blot Western dengan menggunakan serum pesakit yang dijangkiti *Campylobacter*, jangkitan enterik lain dan serum daripada individu yang sihat.

Kesesuaian protein rekombinan seterusnya diuji dengan menjalankan ujian titik EIA yang mengambil masa 3 jam. Daripada keputusan awal kajian ini, ujian titik EIA menunjukkan sensitiviti sebanyak 100% dan spesifisiti 97% untuk mengesan IgA terhadap *C. jejuni* di dalam serum pesakit yang digunakan. Ini menandakan protein rekombinan yang diekspresikan ini merupakan calon yang sesuai di dalam penghasilan ujian alternatif untuk mengesan kehadiran antibodi terhadap jangkitan *C. jejuni*.

CLONING AND EXPRESSION OF THE GENE ENCODING FOR THE 24.1 kDa PROTEIN THAT IS ANTIGENICALLY SPECIFIC FOR *Campylobacter jejuni*

ABSTRACT

Campylobacter jejuni is the most important enteropathogen among the *Campylobacters*. This bacterium is one of the main agents causing diarrheal diseases in humans world-wide. Although this infection is usually self-limiting, it may lead to other systemic infections such as Guillain-Barre Syndrome. Unfortunately, infections caused by this pathogen are under-reported due to technical difficulties faced by conventional methods which include low sensitivity, labour intensive, time consuming and expensive. Hence, there is a need for a simple, user friendly, rapid and specific test to diagnose *C. jejuni* infection.

From previous studies, a native protein of 24.1 kDa specific for *C. jejuni* was identified and characterized. This protein is a possible candidate for the development of a rapid diagnostic test. In developing a rapid protein based test, this protein need to be expressed and purified on a large scale. Unfortunately, production of this native protein is complicated, costly and is time consuming. As an alternative, there is a need to clone and express the protein in an easier expression system which is more convenient and economic.

In this study, the gene encoding for the protein has been successfully cloned and expressed in an *E. coli* expression system and purified using the nickel –metal affinity chromatography system. The purity, antigenicity and specificity of this

protein were tested using sera from patients infected with *Campylobacter*, other enteric diseases and from healthy individuals using the Western blot technique.

A Dot-EIA test was then developed using the recombinant protein. From the preliminary findings, this 3 hour EIA dot blot test showed 100% sensitivity and 97% specificity for detection of IgA against *C. jejuni*. Data from the preliminary study showed that the recombinant protein is a possible candidate for the development of an alternative antibody detection for *C. jejuni* infections.

BAB 1

PENGENALAN AM

1.0 Latar belakang *Campylobacter jejuni*

Campylobacter dinamakan sebagai *Vibrio* mikraerofilik pada asalnya kerana mempunyai persamaan morfologi dengan genus *Vibrio*. Spesis pertama yang dapat dikenalpasti diberi nama *Vibrio fetus* kerana telah ditemui pada fetus kambing yang keguguran. Pada tahun 1927, Smith dan Orcutt telah menemui bakteria yang mempunyai morfologi yang sama di dalam tinja lembu yang mengalami cirit-birit, dan kemudiannya dikenali sebagai *Vibrio jejuni*. *Vibrio coli* pula ditemui di dalam tinja babi oleh Doyle pada tahun 1944 (dipetik dari Vandamme, 2000).

Pada tahun 1963, Sebald dan Veron memindahkan *V. fetus* kepada genus yang baru iaitu *Campylobacter* kerana bakteria ini mempunyai beberapa perbezaan berbanding kumpulan *Vibrio* (dipetik dari Vandamme, 2000). Perbezaan yang ketara ialah daripada segi kandungan guanin dan sitosin, metabolisme yang bukan fermentatif (tidak mempunyai kebolehan menggunakan karbohidrat) dan memerlukan keadaan mikraerofilik untuk tumbuh (Thompson & Blaser, 2000 dan Moore *et al.*, 2005). Sebald dan Veron kemudiannya mengelaskan 3 lagi spesis *Vibrio* ke dalam genus ini yang dinamakan *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* dan *Campylobacter sputorum* (dipetik dari Vandamme, 2000).

Morfologi *Campylobacter* yang jelas ialah sel yang berbentuk S atau seperti burung camar atau berbentuk rod berpintal, bersaiz $0.2\ \mu\text{m} - 0.8\ \mu\text{m}$ (lebar) dan $0.5\ \mu\text{m} - 5$

µm (panjang). Morfologi bakteria ini akan berubah kepada bentuk kokoid jika kultur terdedah kepada atmosfera normal di dalam tempoh yang lama. Ia adalah bakteria gram negatif yang tidak berspora. Kebanyakan spesis adalah motil kerana mempunyai flagela pada salah satu atau kedua-dua bahagian hujungnya.

1.1 Kepentingan *Campylobacter*

Walaupun jangkitan oleh spesis *Campylobacter* pada manusia kurang dilaporkan di Malaysia, tetapi ia masih merupakan salah satu penyebab jangkitan gastroenteritis di seluruh dunia terutamanya di negara yang telah membangun (Oberhelman & Taylor, 2000). Di negara yang sedang membangun, jangkitannya semakin meningkat dari masa ke semasa (Coker *et al.*, 2002). Selain menyebabkan cirit-birit, jangkitan *Campylobacter* boleh menghasilkan kesan yang lebih serius dan terdapat kes kematian dilaporkan walaupun kadar kematian akibat jangkitan ini adalah rendah iaitu 0.05 per 1000 jangkitan (Allos, 2001).

Lebih kurang 80-90% daripada kes kampilobakteriosis disebabkan jangkitan *C. jejuni* (Nachamkin *et al.*, 2000 dan Newel *et al.*, 2000). Spesis ini merupakan punca utama penyakit gastroenteritis di Amerika Syarikat dengan nisbah 1000 untuk setiap 100,000 populasi (Nachamkin, 2005). Friedman *et al.* (2000) pula melaporkan 99% daripada kes kampilobakteriosis yang dicatatkan pada tahun 1995 di Amerika Syarikat berpunca daripada jangkitan *C. jejuni*. Manakala di Kanada pula, untuk tempoh dari tahun 1995 sehingga 1999, 99.4% kes kampilobakteriosis disebabkan

oleh *C. jejuni* dan *C. coli* dengan nisbah 12:1 apabila pengenalpastian spesies dilakukan (data dari Canada Communicable Disease Report, Mac 2003).

Di negara yang sedang membangun, laporan tentang jangkitan *Campylobacter* kurang dilaporkan kerana ketiadaan sistem surveilan atau kajian epidemiologi yang lengkap (Coker *et al.*, 2002). Bagi negara yang telah membangun, *Campylobacter* cuma dapat dikesan daripada pesakit yang menunjukkan gejala, tetapi di negara yang sedang membangun, bakteria ini lebih banyak dikesan di dalam tinja kanak-kanak yang tidak menunjukkan apa-apa gejala. (Oberhelman & Taylor, 2000).

Di Thailand, Mesir, India dan lain-lain negara sedang membangun, *Campylobacter* dilaporkan sebagai punca kepada berlakunya cirit-birit dikalangan pelancong (Oberhelman & Taylor, 2000 dan Coker *et al.*, 2002). Di Malaysia pula, jangkitan *C. jejuni* sememangnya kurang dilaporkan, tetapi beberapa data menunjukkan terdapatnya pelancong yang melawati negara ini pulang dengan jangkitan *C. jejuni* (Rautelin *et al.*, 1991 dan Unicomb *et al.*, 2006).

Walaupun *C. jejuni* merupakan spesies utama di dalam famili Campylobacteriaceae yang menyebabkan kampilobakteriosis, terdapat tiga lagi spesies yang sering dikaitkan dengan jangkitan manusia iaitu *C. coli*, *C. fetus* dan *C. upsaliensis*. Frekuensi pemencilan spesies ini adalah rendah berbanding *C. jejuni*, tetapi ia tetap mempunyai kepentingannya yang tersendiri.

C. coli merupakan spesies *Campylobacter* yang kedua sering menjangkiti manusia. Spesies ini mempunyai sifat biokimia serta memberikan gejala penyakit yang hampir

sama dengan *C. jejuni* dan secara tidak langsung menyukarkan pengenalpastian jangkitan dilakukan. Secara morfologi, keluk *C. coli* lebih merengang berbanding *C. jejuni* dan secara biokimia, ia tidak dapat menghidrolisiskan hipurat seperti mana *C. jejuni* (Penner, 1988).

Sama seperti *C. jejuni*, jangkitan *C. fetus* dan *C. upsaliensis* ditunjukkan dengan gejala seperti cirit-birit, demam dan kadang-kala berlakunya bakteremia. Jangkitan kedua-dua spesis ini sering dilaporkan terjadi pada mereka yang mempunyai sistem imun yang rendah serta pesakit yang mempunyai masalah kesihatan lain seperti diabetik dan kardiovaskular (Bourke *et al.*, 1998; Lastovica & Blaser, 2000 dan Thompspon & Blaser, 2000).

1.2 Transmisi dan pencegahan *C. jejuni* pada manusia

1.2.1 Transmisi *C. jejuni*

Salur gastrousus avian dan haiwan ternakan (seperti lembu, kambing dan babi) mempunyai keadaan yang membolehkan spesis *Campylobacter* mengadaptasi dan seterusnya hidup sebagai flora normal (Villet & Ketley, 2001 dan Hariharan *et al.*, 2004). Jangkitan pada ayam yang ditenak di ladang amat mudah berlaku. Ia boleh bermula dari dua atau tiga ekor ayam dan menjangkiti yang lain melalui makanan dan air yang tercemar. Keadaan ini akan berterusan sehingga ayam ini dibawa ke rumah penyembelihan (Saleha, 2004).

Di Thailand dan New Zealand sahaja, sebanyak 50 - 60% produk ayam mentah didapati tercemar dengan bakteria ini (Oberhelman & Taylor, 2000 dan Wong *et al.*, 2006). Di Malaysia, walaupun tiada data seperti ini, kajian yang dilakukan oleh Saleha pada tahun 2002 menunjukkan kemungkinan berlakunya kontaminasi yang tinggi pada produk ayam/daging. Beliau telah mengkultur 508 sampel swab rektum daripada ayam hidup dan mendapati sebanyak 369 sampel adalah positif bagi *Campylobacter* (73.2% daripada jumlah ini adalah *C. jejuni*). Adalah dipercayai produk ayam/daging tercemar ketika penyembelihan dan pemprosesan akibat daripada kebocoran kandungan usus (Jacobs-Reitsma, 2000). Kontaminasi silang juga boleh berlaku ke atas sayur-sayuran sebelum dituai (menggunakan tinja haiwan sebagai baja) dan ketika diproses bersama-sama produk ayam/daging yang telah tercemar (Wong *et al.*, 2006).

Susu merupakan larutan penampapan yang amat baik dan mungkin membantu bakteria ini hidup di dalam perut yang mengandungi jus gastrik (Blaser & Duncan, 1984) dan jumlah yang terselamat cukup untuk mengakibatkan jangkitan. Susu biasanya dicemari ketika proses pemerahan di ladang oleh tinja lembu ataupun kambing yang dijangkiti. Proses pempasturan diperlukan untuk membunuh semua bakteria yang mencemari susu dan mengelakkan ia basi.

Selain daripada produk makanan, jangkitan yang berpunca daripada air yang tercemar sering berlaku di negara seperti Sweden dan Norway (Moore *et al.*, 2005). Pencemaran air ini mungkin berpunca daripada tinja burung liar ataupun daripada bahan buangan ladang yang dialirkan ke dalam sungai. Jangkitan pada manusia berlaku melalui air yang diminum tanpa diklorinkan atau dimasak, memakan siput

atau tiram yang tercemar (Jacobs-Reitsma, 2000) dan melalui aktiviti seperti berenang (Norio *et al.*, 2004). Manusia juga boleh memperoleh jangkitan *C. jejuni* daripada haiwan kesayangan seperti kucing dan anjing di mana kanak-kanak merupakan mangsa yang paling mudah mendapat jangkitan melalui cara ini (Moore *et al.*, 2005).

Hald *et al.* (2004) mencadangkan jangkitan *Campylobacter* pada ayam melalui lalat sebagai punca peningkatan kes jangkitan pada musim panas (musim pembiakan lalat). Lalat ini dicemari oleh *Campylobacter* apabila ia hinggap di atas tinja haiwan lain dan memindahkannya kepada ayam ternakan melalui makanan yang dihurung. Penyelidik ini mendapati 33 (70.2%) daripada 47 ekor lalat yang dikaji membawa *Campylobacter* dan sebanyak 56.4% merupakan *C. jejuni*. Ini menunjukkan seperti mana jangkitan enterik lain, *C. jejuni* juga boleh disebarkan oleh vektor ini kepada manusia.

1.2.2 Pencegahan

Amalan penyediaan makanan yang bersih seperti membasuh tangan sebelum dan selepas menyediakan makanan serta memasak makanan dengan sempurna (*C. jejuni* amat sensitif terhadap suhu yang tinggi) dapat membantu mengurangkan jangkitan bakteria ini. Peralatan harus dicuci dan dikeringkan selepas memasak kerana walaupun *C. jejuni* dapat bertahan selama kira-kira 4 jam pada permukaan peralatan tersebut (Kusumaningrum *et al.*, 2003), ia amat sensitif terhadap detergen dan proses pengeringan (Mattick *et al.*, 2003). Untuk mengurangkan kontaminasi ke atas

sayuran yang hendak dimakan mentah, pengasingan peralatan memotong daging/ayam dan sayuran perlu dilakukan selain tidak membasuh sayuran bersama-sama dengan produk ayam/daging.

Kontaminasi ketika penyembelihan dan pemprosesan produk ayam/daging perlu dikurangkan untuk mengelakkan jangkitan kepada manusia melalui makanan. Antara langkah yang boleh diambil ialah menggunakan air berklorin yang mengalir semasa menyembelih ayam atau produk daging yang lain, merendam ayam selepas disembelih dengan air panas (dilakukan untuk tujuan membuang bulu, proses ini juga dapat membunuh *C. jejuni*) dan membersihkan kawasan pemprosesan dengan menggunakan disinfektan (Jacobs-Reitsma, 2000).

Sebagai pengawalan jangkitan di ladang, penternak boleh menggunakan air yang berklorin sebagai air minuman haiwan ternakan kerana ia dapat mengurangkan kadar jangkitan (Trachoo, 2003), mengasingkan haiwan yang mengalami cirit-birit dan jika perlu, melakukan pemvaksinan. Pekerja ladang juga perlu membersihkan tangan selepas ke ladang kerana mereka menghadapi risiko jangkitan yang tinggi terutama jika haiwan ternakan mengalami cirit-birit. Selain daripada kawalan jangkitan ketika aktiviti penternakan, rawatan terhadap air buangan yang akan disalurkan ke sungai juga digalakkan untuk mengelak kontaminasi bakteria ini ke dalam sumber air minuman.

1.3 Aspek klinikal jangkitan *C. jejuni*

1.3.1 Gejala klinikal

Dos jangkitan bagi *C. jejuni* adalah serendah 500 cfu/ml (Sikrrow *et al.*, 2000) dan tempoh masa pengesanan sebelum jangkitan menunjukkan gejala ialah 3-7 hari. Walaupun bakteria ini sensitif terhadap keadaan perut yang berasid, jumlah yang dapat hidup mencukupi untuk menyebabkan jangkitan. Gejala yang biasa ditunjukkan ialah cirit-birit, demam, kejang pada bahagian abdomen yang kadangkala disalah-ertikan sebagai appendisitis dan loya. Di negara yang telah membangun, gejala yang ditunjukkan termasuklah cirit-birit berdarah. Ini berbeza dengan negara yang sedang membangun, di mana kebanyakan jangkitan adalah asimptomatik atau pesakit mengalami cirit-cirit berair (Wooldrige & Ketley, 1997; Oberhelman & Taylor, 2000 dan Trachoo, 2003).

Bakteria ini mempunyai kelebihan untuk melekat, menembusi lapisan mukosa perut dan seterusnya masuk ke dalam aliran darah dan mungkin mengakibatkan bakteremia. Walaupun jangkitan ekstraintestinal seperti ini jarang terjadi kerana *C. jejuni* sensitif terhadap kandungan bakterisidal di dalam serum (Skirrow, 2000), ia sering dilaporkan berlaku terhadap pesakit yang mempunyai sistem imun yang rendah seperti pengidap HIV (Skirrow, 2000 dan Allos, 2001).

1.3.2 Komplikasi jangkitan

Antara komplikasi akhir yang berlaku adalah artritis reaktif (Hannu *et al.*, 2002; Nachamkin, 2002 dan Moore *et al.*, 2005), meningitis dan penyakit buah pinggang serta salur kencing seperti nephritis (Skirrow, 2000). Komplikasi jangkitan *C. jejuni* yang lebih serius ialah penyakit autoimmun yang melibatkan sistem saraf periferai iaitu sindrom Guillain-Barré (Skirrow, 2000; Nachamkin, 2002 dan Moore *et al.*, 2005).

Pada masa kini, sindrom Guillain-Barré (GBS) merupakan penyebab utama kepada keadaan lumpuh longlai secara tiba-tiba (acute flaccid parálisis). Seseengah pesakit yang dijangkiti *C. jejuni* menghasilkan antibodi yang melawan struktur seperti gangliosida pada permukaan sel dan struktur ini dipercayai hampir sama dengan gangliosida pada serat saraf periferai (Aspinall *et al.*, 1994; dan Nachamkin *et al.*, 2000). Antibodi ini yang berkemungkinan terlepas dari saluran darah menyerang dan merosakkan gangliosida lapisan meilin pada sistem saraf dan seterusnya mengakibatkan pesakit menjadi lumpuh. Walaupun terdapat banyak agen patogenik yang menyebabkan GBS, kira-kira 30-40% daripada kes GBS adalah disebabkan oleh jangkitan *C. jejuni* (Nachamkin, 2002). Tam *et al.*, (2003) melaporkan terdapat 157 kes GBS di England berpunca daripada jangkitan *C. jejuni* untuk tempoh dari April 2000-Mac 2001.

1.4 Rawatan

Gejala biasanya ditunjukkan 3-4 hari selepas mendapat jangkitan dan hilang dalam masa seminggu selepas itu. Walaupun kebanyakan pesakit akan sembuh tanpa rawatan, peluang untuk berlakunya kembali jangkitan adalah tinggi (Moore *et al.*, 2005). Sebagai rawatan awal, penggantian air dan elektrolit badan akan diberikan untuk pesakit yang mengalami cirit-birit dan muntah terutama kepada kanak-kanak. Terdapat beberapa faktor yang menyebabkan rawatan antibiotik diperlukan, antaranya ialah jika pesakit menunjukkan gejala yang teruk dan berpanjangan, berlaku komplikasi yang serius seperti jangkitan sistemik atau mempunyai sistem pertahanan badan yang rendah.

Erithromisin masih lagi menjadi antibiotik pilihan utama kerana kadar rintangan bakteria ini adalah rendah berbanding antibiotik lain seperti siprofloksasin dan norfloksasin (Trachoo, 2003). Erithromisin bertindak dengan pantas menyingkirkan bakteria ini dari perut dan tinja pesakit. Sebagai alternatif kepada erithromisin, tetrasiklina adalah antara antibiotik yang dicadang walaupun secara praktikalnya ia kurang digunakan (Moore *et al.*, 2005). Untuk pesakit yang mengalami jangkitan sistemik yang teruk, mereka akan dirawat dengan menggunakan antibiotik daripada kumpulan aminoglikosida seperti gentamisin (Skirrow *et al.*, 2000).

Bagi pesakit yang mengalami Sindrom Guillain-Barré, selain diberi antibiotik, rawatan khusus seperti “plasmapheresis” dilakukan untuk mengurangkan kepekatan antibodi di dalam darah. Pemberian immunoglobulin manusia secara intravena (IVIg) juga digunakan sebagai alternatif kepada “plasmapheresis”. IVIg disediakan

dengan memproses campuran plasma penderma. Campuran imunoglobulin daripada penderma ini dipercayai mempunyai antibodi anti-idiotipik yang merencat antibodi khusus penyakit (Nachamkin *et al.*, 2000). Walaupun rawatan ini mahal, ia mudah diberikan kepada pesakit dan lebih selamat.

1.5 Kaedah diagnosis jangkitan *C. jejuni*

1.5.1 Mikroskopi

Pewarnaan Gram dengan menggunakan 0.1% larutan akuas karbol-fusin sebagai pewarna balas menggantikan safranin digunakan untuk mengenalpasti *Campylobacter* daripada slaid tinja secara langsung dan kultur tulen. Walaupun kaedah pewarnaan ini menonjolkan lagi bentuk berkeluk bakteria gram negatif ini, ia memberikan sensitiviti dan spesifisiti yang rendah kerana kesukaran untuk mengesan bakteria ini pada slaid tinja. Selain daripada sel *C. jejuni*, kehadiran sel leukosit yang boleh dilihat pada slaid tinja juga menandakan kemungkinan berlakunya penembusan ke dalam lapisan mukosa perut oleh bakteria ini (Nachamkin, 2005).

1.5.2 Pengkulturan

Terdapat banyak media pertumbuhan yang telah diubahsuai seperti “charcoal cefoperazone deoxycholate agar” (CCDA), kaldu Preston dan media Skirrow

(Nachamkin, 2000) digunakan untuk mengasingkan *Campylobacter* spesis dari tinja pesakit. Di makmal INFORMM, media yang telah diubahsuai oleh Salleh (1994) telah digunakan untuk mengasingkan *Campylobacter* dari sampel tinja. Pengubahsuaian ini dilakukan dengan penambahan suplemen pertumbuhan *Campylobacter* yang mengandungi natrium piruvat, natrium metabisulfat dan ferus sulfat. Arang dan ketiga-tiga bahan ini menggantikan darah yang sering digunakan untuk media selektif *Campylobacter*. Gabungan ketiga-tiga bahan ini juga dapat mengurangkan kesan toksik oksigen terhadap sel (George, 1978 dan Corry *et al.*, 1995). Selain daripada itu, suplemen selektif CCDA yang mengandungi amfoterisin B dan sefoperazon juga ditambahkan kepada media tersebut untuk mengurangkan pertumbuhan yis serta bakteria lain.

Terdapat juga penyelidik yang menggunakan kaedah penurasan untuk mengkultur bakteria ini di mana tinja yang telah dilarutkan dengan larutan penampan salin diturunkan terus melalui kertas turas (saiz liang 0.45-0.65 μm) ke atas agar. Oleh kerana saiz sel *C. jejuni* yang kecil, ia dapat melalui kertas turas yang digunakan. Namun begitu, hanya kira-kira 10% sahaja *C. jejuni* di dalam larutan tinja akan melalui penurasan dan tumbuh di atas agar (Corry *et al.*, 1995).

Campylobacter merupakan bakteria yang memerlukan kepekatan udara yang khusus untuk pertumbuhan iaitu kira-kira 5% O₂, 10% CO₂ dan 85% N₂. Keadaan ini boleh diperolehi dengan meletakkan agar kultur di dalam balang anaerobik bersama-sama kit penghasilan gas yang diperolehi secara komersial (antaranya kit yang dikeluarkan oleh OXOID, USA dan Becton Dickinson, USA).

Seperti kebanyakan *Campylobacter* yang lain, *C. jejuni* dapat tumbuh pada suhu 37°C tetapi pertumbuhan yang optimum diperoleh pada suhu 42°C dengan tempoh pengeraman selama 48-72 jam. Terdapat 2 jenis koloni yang sering ditemui pada agar CCDA yang diubahsuai iaitu koloni yang mendatar, licin, berkilat, berwarna kelabu, melebar mengikut garisan kultur dan koloni yang berbentuk bulat, cembung, licin serta mempunyai pinggir yang sekata. Seperti yang diterangkan sebelum ini, jika diwarnakan dengan pewarnaan Gram, bentuk S atau spiral akan kelihatan di bawah kanta pembesar 100X.

Untuk analisis awal, jika terdapat koloni bakteria (ujian oksidase positif) yang mempunyai ciri-ciri seperti *Campylobacter* yang dapat diasingkan dengan menggunakan keadaan yang dinyatakan di atas dan pada suhu 42°C, ia perlu dilaporkan sebagai spesies *Campylobacter* sehingga ujian pengenalpastian dilakukan (Nachamkin *et al.*, 2000).

1.5.3 Ujian untuk pengenalpastian genus dan spesis.

Setelah memperolehi koloni tulen, ujian yang sering digunakan untuk mengenalpasti genus ialah ujian oksidase, katalase, pewarnaan Gram dan motiliti. Selain daripada itu, ujian fenotip seperti hidrolisis hipurat, ujian suseptibiliti kepada cakera antibiotik kefalotin dan asid nalidixik serta ujian pertumbuhan pada suhu 25°C, 37°C dan 42°C juga digunakan untuk pengenalpastian spesis (rujuk lampiran di mukasurat 125 untuk tatacara ujian).

Seperti yang diterangkan di awal bab ini, oleh kerana *C. jejuni* dan *C. coli* sukar dibezakan daripada segi ciri-ciri fenotip, ujian hidrolisis hipurat digunakan untuk membezakan kedua-dua spesis ini (Nachamkin *et al.*, 2000). Jika terdapat koloni *Campylobacter* yang rintang terhadap asid nalisidik tetapi positif bagi ujian hidrolisis hipurat, ia perlu dilaporkan sebagai *C. jejuni*.

Kerintangan terhadap asid nalisidik tidak lagi boleh digunakan sebagai ujian pengenalpastian di antara *C. jejuni* dan *C. coli* kerana kadar rintangan terhadap asid nalisidik semakin meningkat berikutan peningkatan rintangan terhadap fluoroquinolones. Rajah 1.1 menunjukkan perbezaan keputusan ujian fenotip di antara spesis utama *Campylobacter*.

1.5.4 Kaedah serologi

Pengesanan immunoglobulin di dalam darah yang spesifik terhadap jangkitan *C. jejuni* merupakan asas kepada ujian serologi yang dibangunkan oleh para penyelidik. Ujian serologi banyak digunakan untuk membantu pengesanan jangkitan *C. jejuni* di dalam kes GBS (Schmidt-Ott *et al.*, 2006). Selain daripada untuk tujuan diagnostik, ia juga digunakan untuk pengumpulan data di dalam kajian surveilan dan epidemiologi.

Walaupun jangka hayat IgA dan IgM adalah lebih pendek berbanding dengan IgG, ramai penyelidik yang membangunkan ujian serologi untuk mengesan IgA dan IgM.

Jadual 1.1 Antara ciri fenotip spesis *Campylobacter* yang sering menjangkiti manusia dan perbezaannya dengan *C. jejuni*.
(Adaptasi daripada Penner, 1988)

| Spesis | Ujian | | | | | | | | | |
|-----------------------------|----------|--------|------------------------|--------------------|---------------------------|-----------------------|----|----|------------------------|----------------|
| | Katalase | Nitrat | H ₂ S (TSI) | Hidrolisis hipurat | Hidrolisis asetat indosil | Pertumbuhan optima °C | | | Kerintangan antibiotik | |
| | | | | | | 25 | 37 | 42 | Kefalotin | Asid nalidisik |
| <i>C. jejuni</i> | + | + | - | + | + | - | + | + | R | S |
| <i>C. coli</i> | + | + | - | - | + | - | + | + | R | S |
| <i>C. lari</i> | + | + | - | - | - | - | + | + | R | R |
| <i>C. upsaliensis</i> | + | + | - | - | ND | - | + | + | S | S |
| <i>C. fetus subsp fetus</i> | + | + | - | - | - | + | + | - | S | R |

+ : Positif

- : Negatif

ND: data tidak diperolehi

S: Sensitif

R: Rintang

Blaser dan Duncan (1984) dalam kajian yang dilakukan menyatakan ujian serum IgA ELISA (berasaskan antibodi tunggal) adalah lebih spesifik dan sensitif untuk mengesan jangkitan akut *C. jejuni* berbanding dengan ujian serum ELISA antibodi IgM dan IgG. Kedua-dua penyelidik ini juga mencadangkan pengesanan IgG tidak sesuai digunakan kerana kandungan IgG di dalam darah peminum susu yang kronik adalah tinggi berbanding IgA ataupun IgM. Mereka juga melaporkan IgG dan IgM dapat dikesan sehingga 3 bulan dan IgA kurang dari sebulan di dalam kebanyakan pesakit.

Ketidak-sesuaian pengesanan IgG ini juga dibuktikan oleh Kaldor *et al.* (1983) dan mencadangkan pengesanan IgM dan IgA sebagai penanda jangkitan yang baru berlaku. Rautelin dan Kosunen (1987) juga mencadangkan IgM dan IgA sebagai alat diagnostik untuk mengesan jangkitan akut kampilobakteriosis.

Jika penyelidik di atas menggunakan protein natif sebagai antigen di dalam ujian yang dibangunkan, Schmidt-Ott *et al.* (2005) pula menggunakan dua antigen rekombinan di dalam ujian ELISA untuk mengesan jangkitan *C. jejuni*. Seperti Blaser dan Duncan, mereka juga bersetuju bahawa pengesanan IgA merupakan kaedah yang paling sesuai dengan sensitiviti dan spesifisiti ujian yang dilakukan mencecah 91.9% dan 99%.

1.5.5 Kaedah selain pengkulturan dan serologi

PCR (polymerase chain reaction) sering digunakan untuk mengesan kehadiran *C. jejuni* di dalam makanan dan sampel klinikal selain digunakan untuk mengenalpasti spesis *Campylobacter* daripada kultur tulen. Antara ujian berasaskan PCR yang boleh diperolehi termasuklah “Accuprobe *Campylobacter* culture identification test” (Gen-Probe, USA) untuk mengenalpasti *C. jejuni*, *C. lari* dan *C. coli* (Nachamkin *et al.*, 2000), ujian “Warnex system” (Warnex Diagnostic, USA) dan kit “Taqman *Campylobacter jejuni* detection test” (Applied Biosystem, USA) yang menggunakan kaedah real-time PCR. Kaedah PCR merupakan kaedah yang amat sensitif dan spesifik tetapi merupakan kaedah yang mahal dan memerlukan pengendali yang mahir (Kulkarni *et al.*, 2002).

Kebanyakan ujian pantas untuk mengesan *Campylobacter* dibangunkan untuk mengesan kehadiran *Campylobacter* di dalam makanan dan sampel alam sekitar. Ujian ini memerlukan *Campylobacter* diasingkan terlebih dahulu ataupun menggandakan jumlah bakteria ini dengan menggunakan medium yang diperkayakan dengan nutrien dan hanya dapat mengesan bakteria ini tetapi tidak dapat mengenalpasti spesisnya. Contoh ujian pantas yang berada di dalam pasaran ialah dipstik “Singlepath[®] CAMPYLOBACTER” (Merck, USA) dan kit latex “Microbiology International Microgen *Campylobacter*” (USA) untuk mengesan *Campylobacter* daripada tinja yang telah dikulturkan ke dalam medium yang diperkayakan serta kit “BBL Campyslide Test” (Becton Dickenson) untuk mengenalpasti bakteria ini dari kultur tulen (Nachamkin *et al.*, 2000).

1.6 Tujuan dan rasional penyelidikan

1.6.1 Masalah pengdiagnosan makmal jangkitan *C. jejuni*

Walaupun pengkulturan merupakan piawai emas untuk mengasingkan *Campylobacter* daripada sampel tinja tetapi ia mempunyai kadar sensitiviti yang rendah. Ia juga melibatkan kos yang tinggi kerana memerlukan media khusus dan kit penghasilan gas komersial untuk menyediakan kepekatan udara yang bersesuaian. Di INFORMM sendiri, kos yang diperlukan untuk pengasingan bakteria ini adalah kira-kira RM 6.00/sampel. Nilai ini tidak termasuk kos ujian biokimia (ujian pengenalpastian), kos balang pengermanan dan kos tenaga buruh.

Pengkulturan tinja pesakit yang berusia 2 tahun dan ke bawah untuk mengasingkan *Campylobacter* terkandung di dalam “standard operating procedure” kebanyakan makmal diagnostik hospital Kementerian Kesihatan Malaysia, tapi bakteria ini jarang dapat diasingkan kerana masalah teknikal seperti kekurangan kakitangan yang berkemahiran untuk mengenalpasti koloni bakteria ini dan ketiadaan peralatan yang bersesuaian. Selain daripada itu, tempoh masa yang lama untuk sampel diambil daripada pesakit dan sampai ke makmal untuk dikulturkan juga mempengaruhi pengasingan bakteria ini kerana pendedahan sampel terlalu lama kepada udara akan menyebabkan bakteria yang sensitif ini mati.

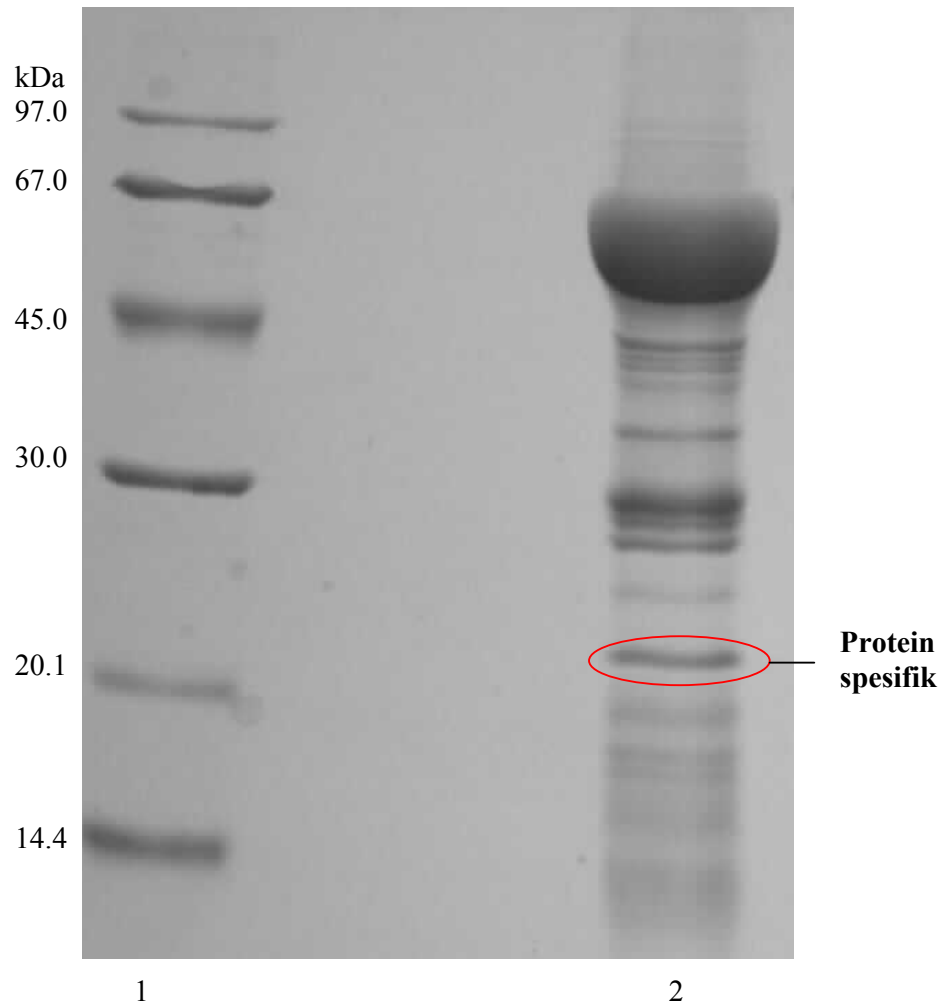
Terdapat kes yang dirujuk di Hospital Universiti Sains Malaysia (HUSM) yang mana seorang pesakit berusia kurang dari dua tahun menunjukkan gejala GBS dan sejarah klinikal menyatakan beliau pernah mengalami cirit-cirit kira-kira 7-10 hari sebelum

gejala ini ditunjukkan. Tinja pesakit telah dihantar dan dikulturkan untuk pengasingan *Campylobacter*. Namun begitu, bakteria ini hanya dapat diasingkan selepas 9 hari dan ujian pengenalpastian yang seterusnya mengambil masa kira-kira 4 hari. Walaupun pesakit ini telah diberikan rawatan dan sembuh, tempoh masa yang terlalu lama yang diperlukan untuk tujuan pengenalpastian punca penyakit GBS ini mempengaruhi keadaan pesakit dan meningkatkan kos perubatan.

Ramai penyelidik yang menggunakan kaedah ELISA dan PCR untuk mengenalpasti jangkitan bakteria tetapi kaedah ini memerlukan peralatan khas dan tidak sesuai digunakan di lapangan. Oleh kerana masalah yang wujud ini, satu ujian yang spesifik, sensitif, mudah, cepat dan murah diperlukan untuk mengenalpasti jangkitan *C. jejuni* secara langsung daripada sampel pesakit tanpa perlu melalui proses yang rumit dan seterusnya mempercepatkan proses rawatan.

1.6.2 Protein permukaan yang spesifik bagi *C. jejuni*

Di dalam kajian yang terdahulu, satu protein yang antigenik dan spesifik untuk *C. jejuni* telah dikenalpasti (Salleh, 1994). Pada awalnya, protein yang berada di permukaan luar sel *C. jejuni* ini dilaporkan mempunyai berat molekul 23-25 kDa (Rajah 1.1). Analisa blot Western menunjukkan protein ini hanya bertindakbalas dengan IgA yang terdapat di dalam serum dan tinja pesakit yang telah dijangkiti oleh *C. jejuni*.



Rajah 1.1 Profil SDS-PAGE menunjukkan protein spesifik untuk *C. jejuni*.

1. Penanda berat protein
2. Protein permukaan luar *C. jejuni*

Berat anggaran proten spesifik ialah 24.1 kDa

Di dalam kajian yang telah dijalankan, walaupun terdapat protein dengan berat molekul yang sama diekspresikan oleh *Campylobacter* spesies yang lain (*C. coli* dan *C. fetus*), beliau mendapati protein tersebut tidak bertindakbalas dengan serum pesakit yang telah dijangkiti oleh *C. jejuni* (Salleh, 1994). Protein ini merupakan calon yang sesuai untuk menghasilkan ujian diagnosis segera untuk mengesan jangkitan *C. jejuni* dalam manusia.

1.6.3 Penentuan dan pencirian gen yang mengkodkan protein khusus

Abdul Wahab (2001), telah melaporkan protein yang ditemui oleh Salleh (1994) melalui kaedah SDS-PAGE ini dianggarkan mempunyai berat molekul 24.1 kDa. Berdasarkan jujukan asid amino, beliau telah berjaya mengklonkan gen yang mengkodkan protein ini dan memperolehi jujukan DNA yang lengkap. Data yang diperolehi digunakan untuk melakukan pengklonan dan pengekspresan protein rekombinan di dalam kajian ini.

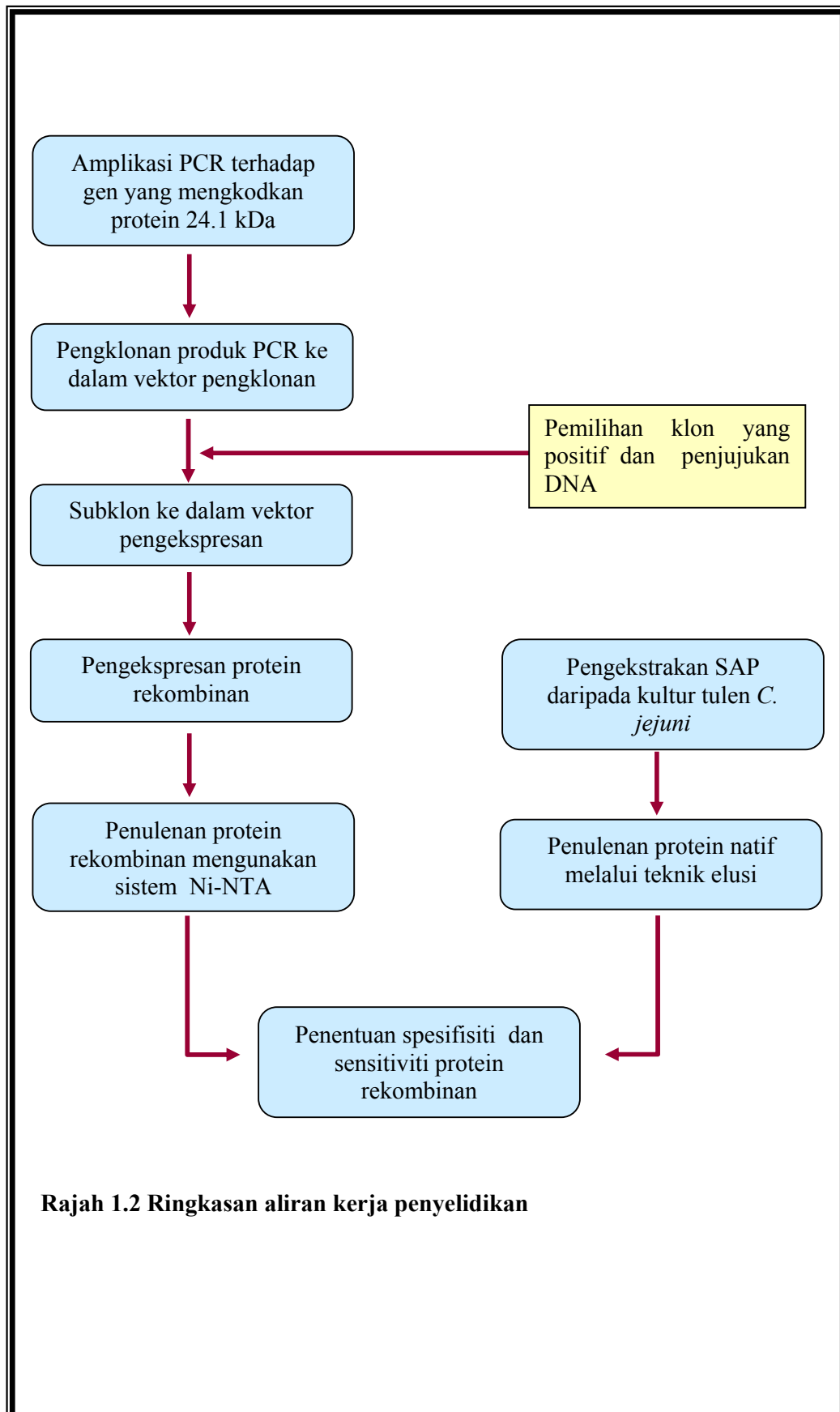
1.6.4 Objektif kajian

Untuk menggunakan protein yang spesifik ini dalam penyelidikan yang seterusnya, ia perlu dituliskan di dalam kuantiti yang banyak. Tetapi penulenan protein tersebut daripada sel *C. jejuni* akan mengambil masa yang lama serta merumitkan dan protein yang terhasil biasanya dalam kuantiti yang sedikit. Jika rekombinan terhadap protein yang spesifik ini dapat dihasilkan, proses penghasilan dan penulennannya menjadi

lebih mudah dan ekonomik. Kajian yang lain juga dapat dilakukan dengan menggunakan protein rekombinan ini. Ketulenan, antigenisiti dan spesifisiti protein rekombinan yang telah dihasilkan ini perlu ditentukan sebelum ia digunakan untuk kajian yang seterusnya. Rajah 1.2 menunjukkan ringkasan kerja untuk kajian ini.

Objektif kajian ini ialah;

- a) Klonkan gen yang mengekspres protein 24.1 kDa dan ekspreskan protein rekombinan dengan menggunakan sistem *E.coli*;
- b) Tentukan antigenisiti protein rekombinan tersebut dengan menggunakan antibodi poliklonal yang dihasilkan daripada arnab dan juga tentukan tag antihistidin dengan kaedah blot Western;
- c) Tulenkan protein yang telah diekspreskan;
- d) Tentukan spesifisiti dan sensitiviti protein rekombinan dengan menggunakan kaedah ujian titik EIA.



Rajah 1.2 Ringkasan aliran kerja penyelidikan

BAB 2

BAHAN DAN KAEDAH PENYELIDIKAN AM

2.1 Organisma dan sampel kajian

2.1.1 Strain bakteria *C. jejuni*

Bakteria *C. jejuni* (Cj-PUSM0301) yang digunakan dalam kajian ini telah diuji ketulenannya dengan kaedah pewarnaan Gram, pemerhatian morfologi koloni di atas agar CCDA, ujian pertumbuhan (pada suhu 37°C, 42°C dan 25°C) dan ujian biokimia seperti ujian hidrolisis hipurat (rujuk lampiran 1.2 untuk tatacara ujian).

2.1.2 Strain *E. coli*

Strain *E. coli* yang digunakan ialah Top 10[®] (Invitrogen, USA) dan BL21 DE3[®] (Stratagene, USA). Strain ini digunakan untuk tujuan pengklonan dan pengekspresan protein rekombinan. Kedua-dua strain ini dikulturkan di atas agar Luria-Bertani tanpa antibiotik.

2.1.3 Penyediaan kultur stok bakteria

Penyediaan kultur stok *C. jejuni* dilakukan dengan memasukkan beberapa koloni tulen bakteria ini ke dalam 2 ml kaldu tripton soya dengan 15% gliserol dan

disimpan pada suhu -70°C sehingga diperlukan. Untuk strain *E. coli* yang digunakan, sebanyak 800 μl kultur (di dalam kaldu Luria-Bertani) yang telah dieramkan semalaman pada suhu 37°C dicampurkan dengan 200 μl 100% gliserol steril dan disimpan pada suhu -70°C sehingga diperlukan.

2.1.4 Serum ujian

Serum ujian yang digunakan di dalam kajian ini terdiri daripada (i) serum positif jangkitan *C. jejuni*; (ii) antibodi poliklonal (anti-24 kDa) yang dihasilkan dalam arnab; (iii) serum daripada pesakit yang dijangkiti oleh bakteria lain seperti *S. typhi*, *Shigella*, *E. coli*, (diperolehi dari serum bank INFORMM); (iv) serum daripada penyembelih ayam dan (v) serum manusia normal (tanpa jangkitan).

2.2 Media pertumbuhan

Semua kaedah pensterilan dilakukan dengan menggunakan mesin autoklaf pada suhu 121°C selama 15 minit. Untuk penyediaan agar, larutan agar yang telah disterilkan, disejukkan kepada suhu 55°C - 65°C (di dalam kukusan air) sebelum dituang ke dalam piring petri. Untuk memastikan tiada kontaminasi berlaku, setiap media akan dieramkan pada suhu 37°C semalaman. Media agar akan disimpan pada suhu 4°C sehingga digunakan. Media kaldu disimpan pada suhu bilik.